

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE - FACULTÉ DE MÉDECINE

Institut d'Hygiène, de Bactériologie et de Parasitologie

DIRECTEUR : PROFESSEUR P. HAUDUROY

L'hydrolyse de l'urée par les mycobactéries : Etude quantitative

THÈSE

présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Lausanne
pour l'obtention du
grade de docteur en médecine dentaire

par

NGUYEN-VAN-NANG

Médecin-dentiste

diplômé des Universités de Paris et de Genève
Originaire de Vinh-Long (Viet-Nam)

LANE MEDICAL LIBRARY
SAN FRANCISCO

LAUSANNE

IMPRIMERIE DES ARTS ET MÉTIERS

1957

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE - FACULTÉ DE MÉDECINE
Institut d'Hygiène, de Bactériologie et de Parasitologie
DIRECTEUR : PROFESSEUR P. HAUDUROY

L'hydrolyse de l'urée par les mycobactéries : Etude quantitative

THÈSE

présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Lausanne
pour l'obtention du
grade de docteur en médecine dentaire

par

NGUYEN-VAN-NANG

Médecin-dentiste

diplômé des Universités de Paris et de Genève
Originaire de Vinh-Long (Viet-Nam)

LAUSANNE
IMPRIMERIE DES ARTS ET MÉTIERS
1957

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE

FACULTÉ DE MÉDECINE

Le Conseil de la faculté de médecine de l'Université de Lausanne, après avoir pris connaissance des rapports favorables de MM. les professeurs Paul Hauduroy et Victor Demole et sans se prononcer sur les opinions du candidat, autorise l'impression de la thèse intitulée :

L'HYDROLYSE DE L'URÉE PAR LES MYCOBACTÉRIES :

ÉTUDE QUANTITATIVE

présentée par M. Nguyen-van-Nang, médecin-dentiste, pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN MÉDECINE DENTAIRE

Lausanne, le 4 juillet 1957.

Le Doyen :

Prof. M. VULLIET.

*Mes pensées sont allées tout au long
de ces travaux*

A mes parents

*envers qui je dois une immense dette
de reconnaissance, car ils m'ont tout donné ;*

A mes frères

*qui ont joint leurs sacrifices
à ceux de mes parents pour me permettre
de préparer cette thèse ;*

A ma femme

*qui a oublié ses propres souffrances
pour m'encourager.*

*C'est à eux que je dédie cette thèse,
avec toute mon affection.*

Lausanne, 1955.

Qu'il nous soit permis de remercier ici, sincèrement et sans avoir l'air de sacrifier à une habitude,

Monsieur le Professeur Paul HAUDUROY, qui nous a ouvert les portes de ses laboratoires, inspiré et dirigé nos travaux en les facilitant dans toute la mesure du possible, et qui nous a témoigné en maintes occasions d'une bienveillance que nous ne saurons oublier ;

les collaborateurs et collaboratrices du Professeur P. Hauduroy, auprès de qui nous avons toujours trouvé quand il le fallait une aide efficace et le réconfort d'une solide amitié.

PLAN

1. L'urée et l'uréase : notions chimiques élémentaires.
2. Travaux antérieurs sur l'hydrolyse de l'urée par les bactéries en général et par les Mycobactéries en particulier : étude qualitative.
3. Essais d'étude quantitative de l'hydrolyse de l'urée par les Mycobactéries.
 - a) Différentes méthodes et méthodes essayées : description rapide.
 - b) Méthode choisie : description, conditions opératoires.
4. Résultats.
Comparaison avec les résultats des autres auteurs.
Conclusions.
5. Sommaire.
Bibliographie.

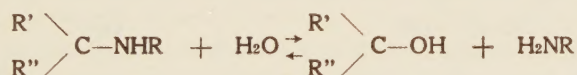


Digitized by the Internet Archive
in 2026

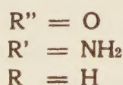
CHAPITRE PREMIER

L'urée et l'uréase : notions chimiques élémentaires

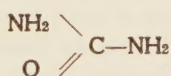
C'est par hydrolyse de l'urée que l'enzyme uréase exerce sa fonction spécifique (19, 26, 27) ; première enzyme obtenue à l'état cristallisé (Sumner, 1926), elle est classée parmi les holoprotéines (protoenzymes), du groupe des Amidases, dont la caractéristique est de catalyser l'hydrolyse ou la synthèse de certaines liaisons carbone-azote (58) :



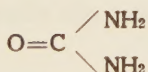
Lorsque



le substrat est l'urée :

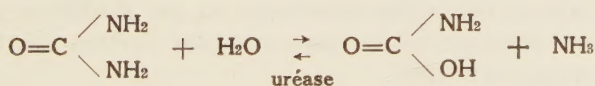


ou :



et l'enzyme qui catalyse l'hydrolyse de cette urée est l'uréase.

L'hydrolyse de l'urée par l'uréase peut s'exprimer ainsi :



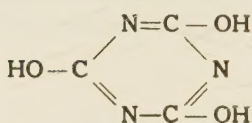
ce qui donnerait (Gale) (26, 27) :



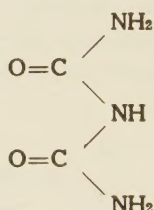
L'hydrolyse de l'urée par l'enzyme spécifique, l'uréase, aboutit donc à la formation d'ammoniaque et de gaz carbonique.

A part cette propriété, l'urée possède encore celle de se décomposer spontanément sous l'action de la chaleur, décomposition qui peut fausser les résultats des essais de dosage. Cette décomposition par la chaleur paraît complexe ; elle donne naissance à divers dérivés par condensation moléculaire. Il se forme, outre de l'acide cyanurique, l'amide de l'acide allophanique ou biuret (68) :

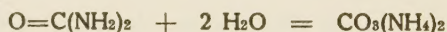
Acide cyanurique



Biuret



L'urée est en outre capable de former des produits d'addition avec les acides, les sels d'urée (oxalate, nitrate d'urée) et des sels doubles avec les sels minéraux ClNa , $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$. Avec des alcools, elle donne des uréines avec élimination d'eau ; avec les hypobromites en milieu alcalin, elle s'oxyde pour libérer de l'azote gazeux (ce qui permet un dosage gazométrique de l'urée). Enfin, et c'est là un fait de non moindre importance pour nous, elle s'hydrate facilement pour donner du carbonate d'ammonium :



hydratation qui a lieu avec une grande facilité sous l'action des lessives alcalines, des acides minéraux, ou par ébullition prolongée des solutions aqueuses pures, sans compter l'action des bactéries, levures et moisissures (68).

De ce bref coup d'œil sur les comportements chimiques de l'urée, nous retiendrons que l'urée est instable si elle est :

en solution aqueuse pure,
ou chauffée,
ou en présence d'acides, d'alcools, d'alcalins, autant de circonstances dont il faut tenir compte quand on veut la doser.

De son côté, l'uréase, si elle est isolée, cristallisée, pesée, présente un comportement chimique non moins complexe. On sait que :

- son pH optimum est voisin de 7 :
6,4 à 6,9 pour l'uréase du soja (Howell et Summer, 1934) (38) ;
7,9 à 8 pour l'uréase des Urobactéries (Mischoustin, 1932) (47) ;
7,5 (Simonart) (58),
- la température optimum de son activité serait 50° C (58),
- son poids moléculaire serait de l'ordre de 480 000 (Svedberg, Pedersen, 1940 — et d'autres auteurs).
(Poids moléculaire de l'hémoglobine humaine : 63 000).

Il est en conséquence nécessaire de tenir compte du pH et de la température optima, dont dépend l'activité de l'enzyme, dans toutes les circonstances où l'on veut étudier le comportement de l'uréase.

CHAPITRE II

Travaux antérieurs sur l'hydrolyse de l'urée par les bactéries en général et les Mycobactéries en particulier : étude qualitative

Sachant que l'urée est hydrolysée par l'enzyme uréase, on a voulu savoir quelles sont les bactéries qui hydrolysent l'urée, autrement dit celles qui possèdent cette enzyme. L'intérêt de cette recherche est évident : la constitution enzymatique différente des microorganismes peut permettre en effet leur différenciation, leur classification, et même l'identification d'un genre ou d'une espèce.

C'est avec ce souci qu'on est amené à mettre en présence différents germes et l'urée, afin d'étudier la décomposition — ou la non décomposition — de l'urée. On constate alors que nombre de bactéries hydrolysent effectivement l'urée.

Söhnngen (60) en 1913 paraît être le premier à étudier ce problème ; la même année Viehover publie une autre étude sur le même sujet. Corper et Sweany (9) en 1918 confirment l'existence de l'activité uréasique de certaines Mycobactéries, signalée par Söhnngen, et en étudient la production, à 37° C, pendant des délais différents, par des souches de Mycobactéries d'origine humaine et d'origine bovine. Mais Lobstein (44) en 1923 cherche en vain cette activité uréasique ; cependant, Den Dooren de Yong en 1926 montre que *M. Phlei* peut pousser sur de simples composés carbonés, prenant son azote de l'urée ou de la diéthylurée ; Gibson (30) en 1935 publie une description et une classification des bactéries qui décomposent activement l'urée, dont surtout *B. Pasteurii* et *Sarciana ureae*. Ukabe (69) en 1936 pense que l'activité uréasique des Mycobactéries signalée par Söhnngen et confirmée par Corper et Sweany serait plutôt incertaine.

Wohlfeil et *Weiland* (75) en 1937 rapportent que les souches *Proteus*, *Corynebacterium pseudodiphtheriae* et certaines souches de *Mycobacterium* « pseudotuberculosis » produisent de l'uréase, tandis que *Escherichia coli* et *Mycobacterium tuberculosis*, ainsi que de nombreuses autres espèces, n'en produisent pas.

Utzino, *Imaizumi* et *Nakayama* (71) en 1938 trouvent aussi que l'urée est facilement hydrolysée par *Proteus vulgaris* et *Staphylococcus aureus*, modérément attaquée par *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa*, mais presque pas décomposée par les bacilles intestinaux, tel *Eberthella typhosa*. Les germes *Torula rubescens*, *Torula rubra* et *Schizosaccharomyces sautawensis* produiraient de l'uréase, d'après *Sakaguchi* et *Shizume* (55) (1937), ainsi que les *Aspergillus niger* et *Penicillium glaucum*, d'après *Miwa* et *Yoshii* (48) (1934). *I. Tsung* et *S. I. Cheng* (69) en 1949 dénie l'intérêt que présente la recherche de l'uréase pour l'identification éventuelle des *Mycobactéries*.

Mais tel n'est pas l'avis de *Singer* et *Cysner* (59), qui en 1952, présentent la première étude vraiment importante sur l'hydrolyse de l'urée par les *Mycobactéries*. Nous nous devons de résumer ici les travaux et résultats de ces deux auteurs, qui serviront d'ailleurs de base de départ à notre étude.

Singer et *Cysner* étudient l'hydrolyse de l'urée par 65 souches de bacilles tuberculeux, d'origine humaine ou bovine, et de bacilles paratuberculeux. Ils ensemencent ces souches — cultivées sur *Petragnani*, *Herrold*, gélose glycinée, *Youmans* — dans trois sortes de milieux synthétiques à l'urée :

Milieu 1. Solution aqueuse d'urée.

Réactif : Nessler (mise en évidence de NH_3).

Composition : Une solution d'urée à 0,5 % dans l'eau distillée exempte d'ammoniaque, filtrée sur filtre Seitz, puis répartie à raison de 1 cc. par tube.

Ensemencer. Incubation à 37° C (un groupe témoin est laissé à la température de la chambre). Après 2, 6, 24 heures, ou plusieurs jours suivant le cas, rechercher la présence d'ammoniaque par le réactif de Nessler.

Une coloration jaune signifie : présence d'ammoniaque = hydrolyse de l'urée = existence de l'uréase.

Milieu 2. Milieu synthétique liquide à l'urée.

Réactif : rouge de phénol (pH 6,8 = jaune ; pH 8,5 = rouge).

Composition :

a) sans glucose :

KH_2PO_4	1 g.
K_2HPO_4	1 g.
Eau distillée	1000 cc.
Rouge de phénol	12 cc. (sol. 2/1000)

Ajuster à pH 6,8 (jaune). Stériliser. Ajouter 20 cc. d'une solution stérile d'urée à 20/1000. Répartir à raison de 1 cc. par tube.

b) sans glucose :

Même formule, avec addition de glucose à 1 %.

Ensemencer deux groupes de tubes, l'un sans glucose, l'autre avec glucose. Mettre à l'étuve à 37° C.

Un virage au rouge signifie : alcalinisation du milieu (pH 8,5) = production de NH_3 = existence de l'uréase.

Milieu 3. Milieu synthétique solide, à l'urée.

Réactif : le même.

Composition : la même, avec adjonction de 22 à 25 gr. de gélose par 1000 cc. de milieu liquide.

Même interprétation du virage.

Les résultats publiés par Singer et Cysner sont portés sur le tableau I. La positivité des tests est signalée, soit par une coloration jaune avec le réactif de Nessler pour le milieu 1, soit par un virage du jaune au rouge pour les milieux 2 et 3.

L'étude des résultats consignés sur le tableau I montre que :

- sur les 65 souches de bacilles tuberculeux et paratuberculeux étudiées, seules deux souches (*Lacticola Pellegrino* et *Pellegrino*) n'hydrolysent pas l'urée ;
- toutes n'hydrolysent pas l'urée dans les mêmes délais. Les bacilles paratuberculeux hydrolysent l'urée en moins de 6 heures, tandis que les bacilles tuberculeux vrais mettent en général beaucoup plus de temps (24 heures à plusieurs jours ou plusieurs semaines).

De la première constatation, Singer et Cysner concluent que l'hydrolyse de l'urée (pour ces auteurs, «production d'uréase») serait la caractéristique du genre *Mycobacterium*.

De la seconde constatation, ils concluent que le test d'uréase pourrait servir à différencier un bacille paratuberculeux d'un bacille tuberculeux vrai, étant donné qu'un bacille paratuberculeux hydrolyse l'urée en moins de 6 heures. Mais ils font immédiatement une réserve : un temps d'hydrolyse plus long ne constitue pas, par contre, la preuve que la souche en question soit un bacille tuberculeux vrai.

Pour nous, quel enseignement retirer déjà des travaux de Singer et Cysner ?

- Nous ne trouvons pas mention du comportement des groupes témoins dans ces différentes expériences.
- L'ensemencement des milieux à l'urée se ferait « largement » (heavily) et à partir de milieux solides (Petragnani, Herrold, gélose glycinée). Nous savons tous combien est difficile à standardiser une telle évaluation et combien peut être irrégulier un tel apport de germes.
- Si le bacille tuberculeux d'origine humaine ou bovine pousse bien à 37° C, par contre les souches d'origine aviaire ne poussent normalement qu'à 42° C. Incubant les différents milieux à l'urée à 37° C, même ceux ensemencés avec des bacilles d'origine aviaire, les auteurs pourraient ainsi empêcher ces bacilles d'avoir des conditions de vie comparables à celles des bacilles tuberculeux d'origine humaine et bovine expérimentés en même temps, et par là empêcher une comparaison possible entre les résultats obtenus.

Le travail de Singer et Cysner pose néanmoins une conclusion nette : les *Mycobactéries* hydrolysent l'urée. Le temps d'hydrolyse est plus court pour les bacilles paratuberculeux que pour les bacilles tuberculeux.

Cette netteté dans les résultats incite les deux auteurs à proposer, ni plus ni moins, le test de l'uréase comme un moyen d'identification et de classification des *Mycobactéries*. Inutile de dire que cette proposition paraît à plus d'un point de vue séduisante.

TABLEAU I

Résultats des tests sur l'activité uréasique de 65 souches de *Mycobactéries*
d'après Singer et Cysner

Désignation des souches	Origine	Production d'ammoniaque dans									
		MILIEU I				MILIEU II				MILIEU III	
		Solution aqueuse d'urée				Milieu synthétique liquide				Milieu synthétique solide	
		(Réact. : Nessler)				(Réactif : rouge de phénol)					
		2 h.	6 h.	24 h.	Jours	2 h.	6 h.	24 h.	Jours	24 h.	Jours
1. 7416 Human H 37 Rv	NCTC	—	—	+		—	—	—	1	—	± 23
2. Human H 37 Rv	ATCC	—	—	+		—	—	—	4	—	± 28
3. 7417 Human H 37 Ra	NCTC	—	—	—	2	—	—	—	4	—	± 26
4. Human (Brevannes)	IPP	—	—	—	2	—	—	—	2	—	± 15
5. Bovine (Ravenel)	ATCC	—	—	—	14	—	—	—	5	—	± 28
6. Bovine (Dupont)	IPP	—	—	—	5	—	—	—	4	—	± 10
7. 6088 Bovine (Cambridge)	NCTC	—	—	—	2	—	—	—	4	—	± 8
8. 5693 Bovine (Vallee)	NCTC	—	—	—	3	—	—	—	2	—	± 28
9. 7091 Avian WP 1720	NCTC	—	—	—	15	—	—	—	—	—	± 18
10. 7092 Avian WP 1745	NCTC	—	—	—	12	—	—	—	10	—	± 20
11. Avian (Sheard)	ATCC	—	—	—	12	—	—	—	16	—	± 8
12. 946 Cold-blooded type (Friedmann)	NCTC	—	—	—	7	—	—	—	—	—	± 3
13. 599 Cold-blooded type	ATCC	—	—	+		—	—	+		+	
14. 9819 Cold-blooded type	ATCC	—	—	+		—	—	+		+	
15. 9823 Cold-blooded type	ATCC	—	—	+		—	—	+		+	
16. B 10 *	IRKB	±	+			±	+			—	2
17. Beck *	IRKB	+	+			+	+			—	2
18. Beck RR *	ISSR	±	+			—	—	+		—	2
19. 280 Berolinense	ATCC	—	—	+		—	—	+		+	
20. 356 Berolinense	ATCC	—	—	+		—	—	+		+	
21. Boquet *	IPP	+	+			+	+			—	2
22. Brinckerhoff I *	NCTC	±	+			±	+				2
23. Brinckerhoff II *	NCTC	±	+			±	+				2
24. 357 Butyricum	ATCC	—	—	+		—	—	+		+	
25. 359 Butyricum	ATCC	—	—	+		—	—	+		+	
26. 360 Butyricum	ATCC	—	—	+		—	—	+		+	
27. 362 Butyricum	ATCC	—	—	+		—	—	+		+	
28. Clegg I *	NCTC	+	+			—	+			+	
29. Clegg II *	NCTC	+	+			—	+			+	
30. Ching Fong *	NCTC	—	—	+		—	—	+		—	2
31. Crottin, Cr 5 *	NCTC	+	+			+	—	+		+	
32. Cummins *	IPP	—	—	—	2	—	—	—	2	—	2
33. Currie *	NCTC	+	+			—	+			+	2
34. Danes *	IPP	—	+			—	+			+	

TABLEAU I (suite)

Désignation des souches	Origine	Production d'ammoniaque dans									
		MILIEU I Solution aqueuse d'urée				MILIEU II Milieu synthétique liquide				MILIEU III Milieu synthétique solide	
		(Réact. : Nessler)				(Réactif : rouge de phénol)					
		2 h.	6 h.	24 h.	Jours	2 h.	6 h.	24 h.	Jours	24 h.	Jours
35. Elly *	NCTC	—	—	+		—	—	+		—	2
36. Fish *	NCTC	—	—	+		—	—	+		—	2
37. Friburgensis *	ICB	—	+			—	—	+		—	2
38. Frog *	ATCC	—	+			—	—	+		—	2
39. Grassberger	IPP	+	+			—	+			—	2
40. Istisan VIII *	ISSR	+	+			+	+			+	
41. Kedrowski *	NCTC	+	+			—	—	+		+	
42. Lanterna *	IPGP	—	—	+		—	—		2	—	6
43. Mayeranne *	IPP	+	+			+	+			+	
44. Marinum	NCTC	—	—	+		—	—	+		—	2
45. Milch *	IRKB	—	+	+		—	+	+		+	
46. Moeller *	IRKB	+	+			+	+			+	
47. Nabarro Bayon *	NCTC	+	+			+	+			+	
48. Needham 361 *		—	—	+		—	—	+		—	2
49. 525 Phlei-Hay	NCTC	+	+			—	+			+	
50. Phlei (Timothy)	ATCC	—	—	+		—	—	+		+	
51. Ranae	ATCC	—	—	+		—	—	+		+	
52. 8159 Smegmatis	NCTC	—	—	+		—	—	+		+	
53. 10143 Smegmatis	ATCC	—	—	+		—	—	+		+	
54. 3820 Stercoris 77	NCTC	—	+			—	+			+	
55. 3821 Stercoris 281	NCTC	—	+			—	+			+	
56. Stercoris 281	ATCC	—	+			—	+			+	
57. Vip 27 *	IPP	+	+			+	+			+	
58. Favia *	IIR	—	—	—	4	—	—	—		—	4
59. Ninni N 16 *	IPP	—	—	—	6	—	—	—		—	6
60. Butter *	IRKB	—	—	—	10	—	—	—		—	15
61. B 31 *	IPP	—	—	—	14	—	—	—		—	16
62. 1472 Lacticola 9626	NCTC	—	—	+		—	—	+		+	
63. 9626 Lacticola	ATCC	—	—	+		—	—	+		+	
64. 8154 Lacticola Pellegrino	NCTC	—	—	—		—	—	—		—	—
65. Pellegrino *	IPP	—	—	—		—	—	—		—	—

ATCC — American-Type Culture Collection.

NCTC — National Collection of Type Culture, London.

IPP — Institut Pasteur, Paris.

ISSR — Istituto Superiore di Sanita, Roma.

IRKB — Institut Robert Koch, Berlin.

IIR — Istituto Igiene, Roma.

ICB — Institutul Cantacuzino, Bucuresti.

Après Singer et Cysner, en 1954, des auteurs français, *Tacquet, Gernez-Rieux* et *Gaudier* (67, 68), ayant constaté les discordances entre les résultats des différents chercheurs sur l'hydrolyse de l'urée par les Mycobactéries, à ce jour, reprennent ce travail d'une façon encore plus complète, si l'on peut dire, et présentent les fruits de leurs recherches dans deux communications successives. Comme nous l'avons fait pour les travaux de Singer et Cysner, nous dégageons ici les principales lignes des expériences de ces trois auteurs.

Tacquet, Gernez-Rieux et Gaudier ont recours à cinq méthodes différentes pour mettre en évidence l'hydrolyse de l'urée : une, très rapide (test d'Elek) pour le dépistage des souches positives ; trois autres, dont une sur milieu solide, pour étudier d'une façon plus certaine l'hydrolyse de l'urée en milieux tamponnés ; enfin, une dernière méthode, sur un milieu solide normalement employé pour la culture des Mycobactéries (Löwenstein), afin de voir si la croissance du bacille ne modifie pas l'action de l'uréase.

Milieu 1. Milieu d'Elek (14).

Réactif : Nessler.

Composition :

KH_2PO_4 à 0,2 M	50 cc.
NaOH à 0,2 N	35 cc.
Urée	4 g.
Eau distillée	200 cc.

Ajuster à pH 7,2. Stériliser. Répartir en tubes à hémolyse à raison de 0,3 cc. par tube. Ensemencer. Incuber à 37° C pendant 3 heures. Déceler l'uréolyse au moyen du réactif de Nessler.

Un virage au jaune signifie : présence de NH_3 .

Milieu 2. Milieu de Ferguson (15, 28).

Indicateur : bleu de bromothymol.

Composition :

KH_2PO_4	0,10 g.
K_2HPO_4	0,10 g.
Alcool à 95°	1 cc.
Urée	2 g.
NaCl	0,50 g.
Eau distillée	100 cc.

La réaction se lit en ajoutant au milieu, au sortir de l'étuve, quelques gouttes de bleu de bromothymol.

Un virage au bleu signifie : réaction positive.

(Coloration vert pâle : pH 6,0 ; coloration bleue : pH 7,8).

Milieu 3. Milieu de Stuart (64).

Indicateur : rouge de phénol.

Composition :

KH_2PO_4	1,82 g.
Na_2HPO_4	1,90 g.
Urée	4 g.
Yeast extract	0,020 g.
Rouge de phénol à 0,02 %	10 cc.
Eau distillée	190 cc.

Ajuster à pH 6,8. Suivre chaque jour le virage de la coloration.

Un virage au rouge signifie : uréolyse.

Milieu 4. Milieu de Christensen (5) (milieu solide).

Indicateur : rouge de phénol.

Composition :

Bacto-peptone	0,5 g.
NaCl	2,5 g.
KH_2PO_4	1 g.
Agar	10 g.
Glucose	0,5 g.
Rouge de phénol	0,006 g.

Ajuster à pH 6,8 ou 7. Suivre chaque jour le virage de la coloration.

Un virage au rouge signifie : uréolyse.

Milieu 5. Milieu de Löwenstein à l'urée.

Indicateur : rouge de phénol.

Composition : Milieu de Löwenstein, avec 2 % d'urée, additionné de rouge de phénol comme indicateur. Culture sur boîte de Pétri.

Comme conditions expérimentales, Tacquet, Gernez-Rieux et Gaudier font les recommandations suivantes :

- Partir de cultures sur milieux solides (Löwenstein-Jensen) et prélever uniquement en surface.
- L'ensemencement doit être fait en quantité suffisante (supérieure à 0,3 mg.) : « il convient... d'ensemencer largement les tubes », car il est apparu que la quantité influe sur les résultats.
- La température d'incubation doit être égale ou supérieure à 37° C (températures les plus favorables : 37° C et 42° C).
- Le temps d'incubation optimum à l'étuve sera de 24 heures pour les milieux de Ferguson, de 3 à 4 jours pour les milieux de Christensen, de 6 à 7 jours pour les milieux de Stuart. Pour les milieux d'Elek, on peut avoir des résultats après 3 heures déjà.
- Les cultures doivent être jeunes (20 à 30 jours sur Löwenstein). Les cultures vieilles de plus de deux mois peuvent ne plus produire d'uréase.
- La croissance des bacilles ne modifie pas leur production d'uréase.

Les résultats obtenus par ces auteurs, avec ces méthodes et dans ces conditions expérimentales, sont rapportés dans le tableau II.

L'étude de ce tableau montre que :

les souches étudiées de bacilles tuberculeux humains déterminent une hydrolyse de l'urée ;

pas de différence entre les variétés virulentes et avirulentes ;

les 15 souches bovines étudiées n'hydrolysent pas l'urée ;

le BCG, par contre, est uréase positif (24 heures avec le Ferguson, 3 heures avec le test d'Elek) ;

les souches aviaires et murines étudiées ne montrent pas d'action uréasique ;

Mycobacterium phlei donne une réaction fortement positive.

L'étude des bacilles paratuberculeux et des bacilles acido-alcoolo-résistants chromogènes montre cependant des résultats « très discordants ». Les souches *thamnopheos*, *milch*, *grassberger*, *smegmatis* sont uréase-positives, mais les souches *pellegrino*, *album Söhn* et diverses souches de bacilles chromogènes isolées des selles se révèlent uréase-négatives.

Outre cette étude sur des souches de collection, Tacquet, Gernez-Rieux et Gaudier ont aussi étudié l'hydrolyse de l'urée par des bacilles tuberculeux humains isolés de produits pathologiques et sensibles aux substances antibacillaires (streptomycine, PAS, INH) et aussi des bacilles tuberculeux humains résistants à l'INH.

Les résultats de ces dernières études, s'ils sont intéressants, ne seront pas reproduits ici, car ils nous concernent moins, étant donné que notre travail portera surtout sur des souches de collection.

TABLEAU II
Résultats des expériences de Tacquet, Gernez-Rieux et Gaudier

Etude de l'uréase pour 28 souches de collection sur milieu de Ferguson (37° C - 24 heures)	
SOUCHES ÉTUDIÉES	HYDROLYSE DE L'URÉE
H 37 Rv	+
H 37 Ra	+
RI Rv	+
RI Ra	+
Bovine Ravenel	—
Bovine Lux. 575	—
Bovine Lux. 779	—
Bovine N° 1 à 15 *	—
BCG Paris	+
Aviaire Sheard	—
Aviaire B	—
Murin	—
Friedmann	—
Mycobacterium phlei	+
* Souches récemment isolées de ganglions de bovidés tuberculeux et dans un cas de porc tuberculeux.	

Des travaux de Tacquet, Gernez-Rieux et Gaudier, nous retiendrons ces notions :

- nécessité d'employer une quantité assez importante de bacilles, âgés de 20 à 30 jours ;
- la température d'incubation ne doit pas être inférieure à 37° C ;
- la croissance des bacilles n'inhibe en aucune façon leur production d'uréase.

Une confrontation rapide des résultats présentés par Singer et Cysner d'une part (tableau I) et par Tacquet, Gernez-Rieux et Gaudier d'autre part (tableau II) montre des discordances nettes (tableau III).

TABLEAU III
*Comparaison entre les résultats de
Singer et Cysner et de Tacquet, Gernez-Rieux et Gaudier*

SINGER ET CYSNER	TACQUET, GERNEZ-RIEUX ET GAUDIER
Toutes les Mycobactéries hydrolysent l'urée (sauf 2 souches sur 65).	Toutes les Mycobactéries n'hydrolysent pas l'urée. Les souches bovines (sauf BCG), murines, aviaires ne l'hydrolysent pas.
Les souches de bacilles tuberculeux d'origine humaine hydrolysent l'urée, mais il semble qu'il y ait une différence d'activité entre les bacilles virulents et les bacilles avirulents.	Pas de différence d'activité entre les bacilles tuberculeux humains virulents et avirulents.
Les bacilles paratuberculeux mettent beaucoup plus de temps à hydrolyser l'urée que les bacilles tuberculeux vrais.	Certains bacilles paratuberculeux hydrolysent l'urée dans les mêmes délais, d'autres ne l'hydrolysent pas du tout.

CHAPITRE III

Essais d'étude quantitative de l'hydrolyse de l'urée par les Mycobactéries

PREMIÈRE PARTIE

Principales méthodes employées pour doser l'urée

Les traités de chimie ou de biologie décrivent un grand nombre de méthodes de dosage d'urée ; que ce soit dosage dans le sang ou dans l'urine, l'on nous propose des procédés des plus simples aux plus compliqués. Dans le bref aperçu que nous donnons ici, nous n'aurons pas la prétention de rappeler toutes les méthodes existantes.

Dans un schéma d'ensemble, nous en nommerons les principales, avec indication brève de leur principe et de leurs références. De ce schéma, nous ne développerons que quelques procédés que nous avons personnellement essayés : dans ce cas, les principes, appareillages, modes opératoires, etc., seront exposés ainsi que les raisons pour lesquelles nous avons dû les abandonner.

Enfin, dans un chapitre spécial, nous décrirons la méthode que nous avons choisie, celle qui nous semble avoir donné les meilleurs résultats dans nos essais d'étude quantitative de l'hydrolyse de l'urée par les Mycobactéries.

SCHÉMA D'ENSEMBLE

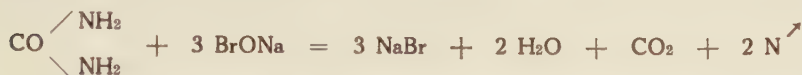
des différentes méthodes de dosage de l'urée

1. *Hypobromite.* Pour dégager N_2 . Doser N_2 par gazométrie : Procédé d'Ambard (4).
2. *Uréase.* Transformation de l'urée en NH_3 . Titrer NH_3 : par acidimétrie :
 - titration en retour, aération (Fleisch (18), Cullen et van Slyke) (72) ;
 - méthode de Conway (6, 7) ;
 - après distillation (méthode personnelle), par colorimétrie : (Nessler)
 - Folin et Youngburg, modifié (21) ;
 - Gentzkow (29) ;
 - Karr (40) ;
 - Leiboff et Kahn.
3. *Uréase.* Transformation en NH_3 et en CO_2 . Doser gazométriquement CO_2 (12, 13, 41, 65, 73) ;
 - Van Slyke, Neill ;
 - appareil de Warburg (73).
4. *Permutite.* Déplacement du NH_3 . Colorimétrie (Nessler) (20).
5. *Nitrate mercurique.* Précipitation de l'urée. Déplacer par distillation. Doser NH_3 (31, 37, 75) :
 - par acidimétrie,
 - par colorimétrie.
6. *Xanthidrol.* Précipitation de l'urée.
 - Peser le précipité (Fosse, Robyn, modifié par François) (22) ;
 - décomposer ce précipité par la méthode de Kjeldahl, doser NH_3 formé :
 - par acidimétrie (Boivin) (2, 3),
 - par colorimétrie (Barrett) (1) ;
 - titrer la dixanthylurée par oxydation permanganique (Luck, Mounier) (45, 49), iodique (Cuny et Robert) (10), chromique (Cordebard, Worthington et Luck (77), Fiorentino, Wenger) (17, 74) ;
 - doser ce précipité par colorimétrie en le dissolvant dans H_2SO_4 , l'oxydant par H_2O et le traitant par le réactif phénolique de Folin (Yoshimatzu, François) (78).
7. *Réactif de Rangier Krebs.* Précipitation du NH_3 en présence d'urée. Doser ce NH_3 (53).

1. Méthode à l'hypobromite : procédé gazométrique (4).

Principe :

Destruction de l'urée par l'hypobromite de soude avec production de H_2O , de CO_2 et d'azote.



Le CO_2 est absorbé par un excès de soude. L'azote restant est mesuré par gazométrie. De son volume on déduit le poids de l'urée décomposée.

Comme cette méthode est le plus souvent citée dans les traités de biologie, et comme elle a l'avantage d'être d'une manipulation simple, nous l'avons essayée en premier lieu.

Appareillage :

- Un uréomètre genre Ambard (plus commode à manier que celui d'Yvon qui nécessite une cuve à mercure). Un tube de verre gradué, muni à sa partie supérieure d'un robinet permettant la communication avec une partie plus large de diamètre. L'extrémité inférieure est coiffée d'une poire de caoutchouc, contenant des perles de verre.
- Solution d'acide trichloracétique :
Acide trichloracétique : 20 g.
Eau distillée qsp 100 cc.
- Lessive de soude à 36° Baumé.
- Solution titrée à 1/1000 d'urée, dans de l'eau distillée avec 2 à 3 g. de phénol pur (pour la conservation). L'urée pure est desséchée dans le vide au-dessus de l'acide sulfurique avant d'être pesée.
- Solution extemporanée d'hypobromite de soude :
Mélanger au moment de l'emploi, à volumes égaux, les deux solutions suivantes :

Solution A :	lessive de soude (d : 1,33)	55 cc.
	iodure de potassium	0,20 g.
	eau distillée	100 cc.
	(Dissoudre l'iodure dans 20 cc. d'eau, ajouter la soude, compléter à 100 cc.) ;	

Solution B :	brome	8,5 cc.
	bromure de potassium	50 g.
	eau distillée	82 cc.
(Dissoudre le bromure à chaud dans de l'eau, laisser refroidir et verser dans un flacon émeri de 125 cc. Mesurer le brome avec précaution dans une petite éprouvette et le verser immédiatement dans la solution précédente au moyen d'un grand entonnoir. Agiter le mélange.)		

Mode opératoire :

Défécation. Dans un verre à pied, mesurer à la pipette 5 cc. de milieu à l'urée (prise d'essai) et 5 cc. de solution d'acide trichloracétique. Mélanger intimement. Filtrer ou centrifuger à grande vitesse.

Dosage. Prélever à la pipette 5 cc. du filtrat, correspondant à 25 cc. du milieu de l'urée. L'uréomètre est retourné et rempli à moitié de perles de verre, puis coiffé du manchon de caoutchouc. Le robinet étant ouvert, comprimer à fond l'ampoule de caoutchouc, puis, en maintenant la compression, fermer le robinet.

Verser les 5 cc. de filtrat dans la partie supérieure de l'uréomètre, puis ouvrir le robinet pour faire descendre le liquide dans la partie inférieure. Ajouter autant d'eau distillée qu'il est nécessaire pour que, la poire de caoutchouc étant comprimée à fond, le niveau d'eau affleure juste au-dessus du robinet. De cette façon, on a chassé toutes les bulles d'air du liquide. Fermer le robinet, la poire restant comprimée à fond. Verser alors, dans la partie supérieure de l'uréomètre, 6 à 8 cc. de la solution extemporanée d'hypobromite de soude. Ouvrir doucement le robinet, laisser descendre l'hypobromite par aspiration, refermer le robinet juste avant que tout l'hypobromite soit passé, afin de ne pas laisser entrer l'air.

Laisser l'uréomètre dans une cuve à eau à 20° C pendant une vingtaine de minutes. Agiter 3 à 4 fois l'appareil en s'aidant des perles de verre pour activer le dégagement gazeux.

Finalement, l'appareil étant tenu verticalement dans l'eau, enlever la poire de caoutchouc sous l'eau, pour ne pas laisser entrer l'air ; laisser reposer 10 minutes ; amener le niveau du liquide dans l'appareil au même niveau que l'eau à l'extérieur et lire alors le volume de gaz dégagé.

Opérer de la même façon, simultanément ou tout de suite après, avec 2,5 cc. de solution d'urée titrée à 1 p. 1000.

Soit : N' , le nombre de cc. d'azote dégagé par la solution d'urée
 et N , le nombre de cc. d'azote dégagé par la prise d'essai.
 La teneur de la prise d'essai en urée est donnée par
 l'expression :

$$\frac{N}{N'} = P \text{ grammes d'urée par litre.}$$

Résultats :

Avec cette méthode, nous avons essayé de déterminer la quantité d'urée hydrolysée par des souches de Mycobactéries ; en mettant par exemple une souche déterminée, cultivée sur milieu liquide, en présence d'une quantité connue d'urée, pendant un temps plus ou moins long, à l'étuve à 37 °, et en dosant ensuite l'urée restante.

Du fait de leur manque de précision et de leur inconstance, les résultats obtenus sont insatisfaisants. La comparaison entre les différents résultats est impossible. Après maints essais, nous avons préféré abandonner cette méthode.

2. Conversion de l'urée en NH_3 par l'uréase : dosage du NH_3 par titrimétrie.

Principe :

Traiter la solution à l'urée par de l'uréase. Déplacer par une base le NH_3 produit ; faire barboter ce NH_3 dans une quantité connue d'acide à titre connu.

Description de la méthode, d'après Fleisch (18) :

On se sert d'une série de trois flacons laveurs, le troisième étant relié à une trompe à eau.

Dans le premier flacon, où l'air entre directement, se trouve du SO_4H_2 concentré (40 0/0) pour débarrasser l'air de l'ammoniaque qui s'y trouve toujours en petite quantité.

Dans le troisième flacon on met :

SO_4H_2	$N/10$	20 cc.
Eau distillée		20 cc.

Entre le premier et le deuxième flacon, une pince permet de fermer et d'ouvrir la communication. On a intérêt à installer une autre pince entre le troisième flacon et la trompe à eau pour régler plus facilement le débit d'aspiration et empêcher un retour du liquide.

Les trois flacons étant en place, on verse dans le deuxième flacon :

Solution à l'urée	20 cc.
Eau distillée	20 cc.
Uréase commerciale	0,1 g.

Placer ce flacon au bain-marie à 40° C pendant 30 minutes pour permettre à l'enzyme uréase de décomposer l'urée en acide carbonique et en ammoniacque. La communication est fermée pendant ce temps entre le premier et le deuxième flacon.

Après 30 minutes, sortir le deuxième flacon du bain-marie, puis y ajouter la solution suivante :

CO ₃ Na ₂	10 g.
NaCl	une pincée
Huile de vaseline ou alcool amylique	5 cc.
Phénolphtaléine	quelques gouttes
Eau distillée	20 cc.

(Le CO₃Na₂ est nécessaire pour chasser le NH₃ de sa liaison carbonate d'ammonium ; l'huile de vaseline ou l'alcool amylique est destiné à empêcher la formation d'écume ; la phénolphtaléine sert à s'assurer de l'alcalinité de la solution.)

Refermer le deuxième flacon, faire marcher la trompe à eau, ouvrir délicatement la première pince. Laisser l'appareil en marche pendant environ 2 heures. Au bout de ce temps, ouvrir le troisième flacon et titrer sa solution avec du NaOH N/10 et du rouge de méthyle comme indicateur.

Variante à cette méthode :

Pour pouvoir déplacer le NH₃ de la solution contenue dans le deuxième flacon sans avoir à l'ouvrir pour y verser la solution de CO₃Na₂, dans le but d'éviter toute perte, nous avons intercalé, entre le premier et le deuxième flacon, le système suivant :

Un Té de verre est embranché ; il est muni à son ouverture inférieure d'un robinet ou d'une pince permettant la communication avec un récipient contenant une solution de CO₃Na₂. Ses deux ouvertures supérieures communiquent avec le premier flacon (pince 1 entre le premier flacon et le Té) et avec le deuxième flacon. Après chauffage

du deuxième flacon au bain-marie, la pince 1 étant fermée et la pince 3 ouverte, faire fonctionner doucement la trompe à eau, puis ouvrir pendant 1 à 2 secondes la pince 2. La solution de CO_3Na_2 est ainsi aspirée et amenée dans le deuxième flacon, sans qu'on ait jamais ouvert le deuxième flacon. Une fois la pince 2 refermée, ouvrir la pince 1 afin de permettre le passage de l'air à travers les trois flacons.

Résultats :

Nous avons essayé avec une solution d'urée à 3 p. 1000 dans de l'eau distillée exempte d'ammoniaque et avec de l'uréase commerciale (Paul Lewis, Wis., U.S.A.).

Les chiffres obtenus donnant la concentration en urée de la solution essayée sont de dix fois inférieurs aux chiffres théoriques. Nous avons alors remplacé l'uréase de Paul Lewis par des graines de soja broyées, sans obtenir beaucoup d'amélioration.

Nous avons refait une série d'expériences avec, à la place de CO_3Na_2 , du NaOH concentré, espérant un déplacement total du NH_3 ; en plus, nous avons installé le dispositif en Té, pour éviter toute perte possible. Les résultats restent médiocres.

Avec une troisième série d'expériences, où le temps d'action de l'uréase sur l'urée est volontairement augmenté (porté à 15 heures), nous obtenons une amélioration des résultats qui cependant restent nettement insuffisants.

Enfin, nous avons essayé de faire des titrations toutes les heures en laissant le contenu du deuxième flacon inchangé. En faisant la somme des résultats partiels obtenus, on retrouve enfin la quantité de NH_3 déplacé, telle qu'elle devrait être. Mais la perte de temps est énorme et hors de proportion avec la précision des résultats ; aussi, avons-nous préféré abandonner cette méthode.

3. *Conversion de l'urée en NH_3 par de l'uréase : distillation et titrimétrie (méthode personnelle).*

Principe :

Faire agir de l'uréase sur de l'urée ; le NH_3 formé est libéré par distillation, après que par une base forte, on l'ait déplacé. Le produit de distillation est refroidi et recueilli dans une quantité connue d'acide titré. Titrer en retour par une base à titre connu.

Appareillage :

La solution à l'urée, avec de l'uréase, est placée dans un ballon fermé par un bouchon percé de deux trous. Dans l'un arrive un récipient en forme d'entonnoir, muni d'un robinet qui contient du NaOH concentré. De l'autre part un tube qui passe à travers un réfrigérant, genre Liebig, et immerge finalement dans un flacon contenant du H_2SO_4 N/10.

Faire arriver dans le ballon environ 5 cc. de NaOH concentré, chauffer et recueillir le liquide distillé dans le flacon de H_2SO_4 . Titrer en retour avec NaOH N/10.

Résultats :

Des essais avec les solutions au chlorure d'ammonium de concentration connue ont donné d'excellents résultats (chiffres concordants avec les chiffres théoriques). Par contre, avec une solution à l'urée de concentration connue, la quantité de NH_3 dégagée se révèle supérieure au chiffre escompté.

L'expérience ayant été répétée plusieurs fois et ayant donné toujours les mêmes résultats, nous avons abandonné cette méthode.

4. Méthode de Conway (6, 7).

Principe :

Même principe que pour la méthode précédente, mais nécessite un récipient spécial : l'instrument de Conway. Cet instrument comporte deux compartiments concentriques ; dans le compartiment extérieur, on met la prise d'essai avec de l'uréase. L'ammoniaque formée est libérée par addition de carbonate de potassium saturé, diffuse et est absorbée par de l'acide borique qui se trouve dans le compartiment interne. On détermine la quantité d'ammoniaque dégagée par titrimétrie.

5. Nitrate mercurique et titrimétrie.

Principe :

Le nitrate mercurique $(\text{NO}_3)_2\text{Hg}$ donne en présence de l'urée un précipité complexe. Prendre du bichromate de potassium comme réactif coloré. Mesurer la quantité de nitrate mercurique pour faire précipiter l'urée. Cette quantité est proportionnelle à la quantité d'urée employée.

Méthode :

Pour des prises d'essai, nous avons utilisé 10 cc. de solution d'urée à 6 p. 1000 (moléculaire/10), auxquels on ajoute un peu de NaOH concentré et du bichromate de potassium. On laisse tomber goutte à goutte du nitrate mercurique en milieu acide (acide nitrique) contenu dans une burette, sur la solution d'urée. Il se forme un précipité uniforme, blanchâtre : c'est l'urée qui précipite. Continuer jusqu'à virage au jaune de ce précipité blanchâtre : le mercure précipite.

Résultats :

Le virage est difficile à apprécier, de plus les résultats sont inconstants.

Variante :

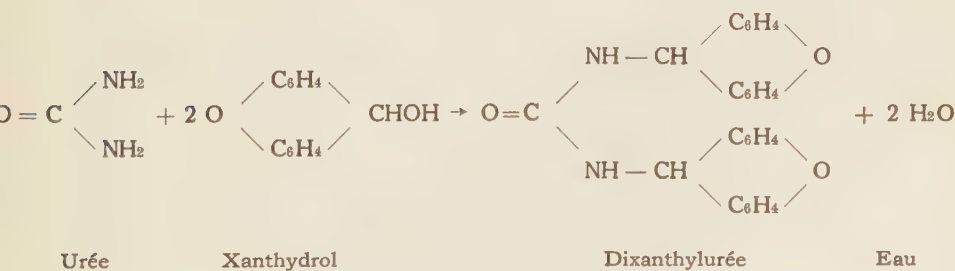
Nous avons essayé de prendre du CO_3Na_2 saturé au lieu de NaOH. Les résultats ne se sont pas améliorés.

DEUXIÈME PARTIE

Méthode pondérale au xanthydrol

Principe :

La méthode est basée sur la précipitation de l'urée par le xanthydrol en milieu acétique et alcoolique. Deux molécules de xanthydrol s'unissent à une molécule d'urée pour former une combinaison insoluble qui a reçu le nom de dixanthylurée et dont le poids moléculaire est sept fois plus élevé que celui de l'urée (16, 22, 23, 24).



Avantages de la méthode :

Le xanthydrol précipite *totale*ment l'urée ; il est sans effet sur les substances accompagnant l'urée dans les liquides organiques ou dans les milieux de culture microbiens. Cette méthode *pondérale* est précise.

Procédé :

Nous employons ici la méthode de Fosse, modifiée par Mestrezat et Janet (46).

Réactifs :

— Réactif déféquant de Fosse :

Chlorure mercurique	2,71 g.
Iodure de potassium	7,20 g.
Acide acétique cristallisable	66,6 cc.
Eau distillée	qsp 100 cc.

— Une solution extemporanée de xanthydrol au 1/10 dans de l'alcool méthylique absolu :

Xanthydrol	1 g.
Alcool méthylique 99°-100°	10 cc.

Le xanthydrol est un produit dont la conservation est capricieuse. Il faut le garder à l'obscurité et à la glacière. Il doit se dissoudre facilement et intégralement dans 10 volumes d'alcool méthylique. On peut utiliser cependant, après filtration, un produit qui laisse un léger résidu par action de l'alcool méthylique.

— Acide acétique cristallisable.

— Alcool méthylique absolu.

Matériel :

- Une balance de précision sensible au 1/10 de milligramme ;
- une étuve à 100° ;
- une trompe à vide ;
- deux pipettes jaugées de 10 cc. ;
- deux pipettes jaugées de 15 cc. ;
- une pipette de 2 cc. divisée en 1/10 de cc. ;
- un vase à précipitation (bécher) de 50 cc., avec un agitateur ;

- une fiole conique tubulée (fiole à vide) ;
- un creuset filtrant Schott en verre d'Iéna poreux, 10 G4. Ce creuset sera adapté à la fiole à vide au moyen d'une bague de caoutchouc et d'une tulipe de verre. Avant chaque dosage, le creuset sera lavé au mélange sulfonitrique, puis rincé et séché à 100°, refroidi au dessiccateur et pesé sur la balance de précision. Pendant le dosage, il y a intérêt à le manipuler avec des brucelles ;
- un dessiccateur.

Mode opératoire :

1) Défécation.

Dans un tube à centrifuger, mesurer :

Prise d'essai	10 cc.
Réactif de Fosse	10 cc.

Mélanger intimement à l'aide d'un agitateur. Centrifuger à grande vitesse. (On peut aussi filtrer sur papier filtre plissé.) Décanter le liquide clair à l'aide d'une pipette, dans un verre, sans entraîner le précipité.

Prélever à la pipette 15 cc. de filtrat et les verser dans le vase à précipitation.

Ajouter 15 cc. d'acide acétique cristallisable, puis la solution au 1/10 de xanthidrol : 3 cc. par fractions de 1 cc., toutes les 10 minutes.

Agiter, puis laisser reposer 3 heures.

2) Tarer un creuset Schott 10 G4 préalablement lavé, rincé, séché et refroidi. Adapter le filtre à l'aide d'un manchon de caoutchouc sur la tulipe de verre et installer le tout sur la fiole à vide. Verser le liquide et son précipité dans le creuset. Faire marcher la trompe à eau. Ne jamais attendre que le liquide versé soit complètement passé pour recharger le filtre car ce dernier se colmaterait et rendrait la filtration très longue.

Laver le bécber en s'aidant de l'agitateur, avec quelques cc. (3 cc.) d'alcool méthylique absolu, par fraction de 0,5 cc. versés d'abord dans le verre, puis sur le filtre.

Lorsque tout le liquide aura passé, enlever le creuset et, le tenant avec des brucelles, le laver extérieurement avec un peu d'alcool méthylique. Le porter à l'étuve sur une plaque de verre. Amener l'étuve progressivement à 100° C. Laisser pendant une heure, puis refroidir dans un dessiccateur.

Porter le creuset complètement refroidi sur la balance et repeser. La différence de poids, avant et après la filtration, correspond au poids du précipité qui est sept fois supérieur au poids de l'urée de la prise d'essai.

La teneur en urée du liquide à titrer est donnée par l'expression :

$$\text{urée en g./litre} = \frac{\text{Poids en g. de dixanthylurée}}{7} \times \frac{1000}{7,5}$$

ou :

$$\text{poids en g. de dixanthylurée} \times 19,04 = \text{urée en g./litre.}$$

Il est recommandé, pour avoir un dosage précis, de respecter les proportions et la durée des opérations. Les meilleurs résultats sont obtenus pour une dose variant de 0,50 g. à 2 g. d'urée par litre de liquide à étudier.

Notons enfin que la dixanthylurée n'est pas hydrophile et une fois le creuset contenant le précipité séché et refroidi, on peut le manipuler sans redouter des variations de poids influençant la pesée.

Choix et préparation du milieu :

Après plusieurs tâtonnements, notre choix se porte sur le milieu de Dubos, comme milieu de culture des souches de Mycobactéries dont nous voulons étudier l'uréase par la méthode pondérale au xanthidrol. Non seulement c'est un milieu liquide, ce qui dans cette méthode est essentiel pour les manipulations, mais il permet aussi une croissance rapide des Mycobactéries dans tout le milieu, en culture homogène. Les prélèvements sont ainsi réduits à une uniformité acceptable.

1. Les souches de Mycobactéries lyophilisées sont ensemencées en Dubos, dans des ballons de 100 cc. Lorsque la culture s'est développée et qu'elle présente un trouble homogène, nous faisons des prélèvements pour l'étude de l'hydrolyse. Ces prélèvements se font à la pipette de 1 cc. graduée au 1/100. Nous prenons $\frac{1}{2}$ cc. de culture pour chaque tube de milieu à l'urée.
2. Le milieu à l'urée est constitué par de l'eau physiologique à laquelle nous avons ajouté 2 ‰ d'urée cristallisée pure (Fluka & Cie, Buchs, Suisse). Après stérilisation par filtration à travers des bougies Chamberland L3, ce milieu est réparti à raison de 1 cc. par tube. Nous divisons alors ces tubes en deux lots.

Aux tubes du premier lot, nous ajoutons à la pipette, comme dit précédemment, $\frac{1}{2}$ cc. de culture microbienne en Dubos.

Aux tubes du second lot (constituant les témoins 1), nous ajoutons, dans les mêmes conditions, $\frac{1}{2}$ cc. de Dubos stérile.

Enfin, nous préparons un troisième lot de tubes, contenant chacun 1 cc. d'eau physiologique stérile, sans urée. A chaque tube de ce dernier lot, nous ajoutons, toujours dans les mêmes conditions, $\frac{1}{2}$ cc. de culture microbienne en Dubos. C'est le lot témoin 2. Ce qui nous donne :

Lot N° 1	LOTS TÉMOINS	
	Lot N° 2, témoin 1	Lot N° 3, témoin 2
1 cc. eau physiologique, additionnée d'urée + $\frac{1}{2}$ cc. culture micro- bienne en Dubos.	1 cc. eau physiologique, additionnée d'urée + $\frac{1}{2}$ cc. Dubos stérile.	1 cc. eau physiologique + $\frac{1}{2}$ cc. culture micro- bienne en Dubos.

Nous avons ainsi, à côté des tubes de culturesensemencées sur milieu à l'urée, deux témoins qui nous permettront de vérifier, s'il y a uréolyse,

que l'uréolyse est bien due à l'action uréasique des microbesensemencés et non à une transformation chimique quelconque de la solution physiologique additionnée d'urée,

que l'urée lysée, enfin, provient uniquement de l'urée ajoutée au milieu et non du métabolisme des microbes en question.

Une fois les trois lots préparés, nous paraffinons soigneusement les tubes et les mettons à l'étuve à 37^0 C. Tout de suite avant la mise à l'étuve, nous faisons un dosage de l'urée (dosage après 0 heure) pour vérifier que la quantité d'urée contenue dans les tubes des lots N° 1 et N° 2 est bien la même. Puis, nous faisons des dosages de l'urée après 24 heures d'étuve, après 3 jours, 6 jours, 9 jours, 12 jours et 15 jours d'étuve.

Pour chaque dosage (ou titration), nous procédons comme suit :

A chaque tube des trois lots, ajouter 10 cc. d'eau distillée. Bien mélanger. Avec une pipette jaugée, prélever 10 cc. de mélange, mettre dans un tube à centrifuger et déféquer avec 10 cc. (pipette jaugée) du réactif de Fosse :

10 cc. du mélange.

10 cc. du réactif de Fosse.

Mélanger, centrifuger à grande vitesse (ou filtrer sur papier filtre), décanter, etc. Le reste de l'opération se déroule exactement comme nous l'avons déjà indiqué au début de ce chapitre.

Après pesée, nous trouverons :

Lot N° 1 :	poids du précipité	x mg.
Lot N° 2 :	poids du précipité	y mg. (témoin)
Lot N° 3 :	pas de précipité	0 mg.

x est toujours plus petit que, ou égal à y : $x \leq y$ suivant qu'il y a ou qu'il n'y a pas hydrolyse de l'urée dans le lot N° 1. Comme le poids du précipité est de sept fois supérieur au poids de l'urée correspondante,

l'expression
$$\frac{y - x}{7}$$

donne la quantité d'urée hydrolysée dans chaque tube du lot N° 1.

Remarque :

Nous avons incubé les souches d'origine aviaire à 42° C au lieu de 37° C, en présence d'urée ; en effet, nous pensons que la production d'uréase peut être inhibée ou inexistante si la souche n'est pas placée dans les conditions optima de son développement. Naturellement, les témoins correspondants sont incubés à la même température.

Nous avons essayé enfin, à titre de comparaison, d'étudier quelques souches telles que *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacille pyocyaneus* et *Staphylocoque doré*. Ces souches sont cultivées non plus en Dubos, mais sur des milieux appropriés (bouillon ordinaire, bouillon ascite, etc.). Pour l'étude uréasique de ces souches, nous procédons exactement comme pour les *Mycobactéries* en remplaçant le milieu de Dubos par le milieu de culture approprié à chaque souche.

Exemple : *Proteus vulgaris*, culture en bouillon ordinaire.

Milieuensemencé	Témoin 1	Témoin 2
1 cc. eau physiologique, additionnée d'urée +	1 cc. eau physiologique, additionnée d'urée +	1 cc. eau physiologique stérile (sans urée) +
1/2 cc. de culture micro- bienne en bouillon or- dinaire.	1/2 cc. de bouillon ordi- naire stérile.	1/2 cc. de culture micro- bienne en bouillon or- dinaire.

Voici donc, en résumé, les conditions expérimentales :

Les souches à étudier seront cultivées en *milieux liquides* pour permettre un prélèvement constant et aussi uniforme que possible. Les Mycobactéries seront, de préférence, cultivées en milieu de Dubos qui permet une culture homogène et en profondeur.

Ces cultures ne seront *pas trop vieilles* : trois semaines en général pour les cultures de Mycobactéries en Dubos.

Le prélèvement des microbes (qui doivent être mis en contact avec l'urée) sera *important* et toujours pareil pour tous les germes. Nous pensons qu'il faut au minimum $1/2$ cc. de culture pour 1 cc. de milieu à l'urée.

Le *milieu à l'urée*, pour la commodité de la préparation, sera de l'eau physiologique à 2 0/0 d'urée, au maximum, dans les conditions opératoires décrites. On peut le remplacer par un milieu ayant exactement la même composition de base que le milieu de culture du germe à étudier (par exemple : pour une Mycobactérie cultivée en Dubos, on peut prendre, comme milieu à l'urée, du Dubos à l'urée).

Par contre, les résultats ne seraient pas aussi favorables si l'on prenait seulement, comme milieu à l'urée, une solution d'urée en eau distillée.

La *température d'incubation* sera de 37° C pour les Mycobactéries d'origine humaine ou bovine et de 42° C pour celles d'origine aviaire.

Le *temps d'incubation* variera avec les souches. Nous pensons cependant qu'un minimum de 24 heures, avec la méthode au xanthydrol, est nécessaire. Nous faisons des dosages après 24 heures d'étuve et par la suite, tous les 3 jours.

Il faut se conformer strictement aux *proportions et temps exigés* pour le dosage de l'urée au xanthydrol. Chaque dosage durant au minimum 6 heures, il est prudent de ne faire qu'une titration — ou une série de titrations — par jour, en commençant le matin.

Enfin, une excellente *balance de précision* (sensible au $1/10$ de milligramme) sera nécessaire.

CHAPITRE IV

Résultats et conclusions

Dans les conditions opératoires citées, voici, consignés en trois tableaux, les résultats que nous avons trouvés (tableaux IV, V, VI).

Nous avons traduit ces résultats par six planches portant les courbes d'activité uréasique des principales souches uréase-positives.

TABLEAU IV

Souches étudiées	Numéro CCTM	Origine	Poids en mg. de l'urée lysée par 1/2 cc. de culture de la souche en Dubos à 37° C.					
			Après : 24 h.	3 j.	6 j.	9 j.	12 j.	15 j.
RIRa	571	Trudeau N.-Y.	0,7	5,1	7	9	7,2	6,5
RIRv	572	Trudeau N.-Y.	2,5	1,1	0,3	0,1	0	0
H 37 Ra	569	Trudeau N.-Y.	0	0,1	0,1	0,3	0,1	0,2
H 37 Rv	570	Trudeau N.-Y.	0,5	0,5	0,6	1,0	1,5	1,4
BCG	50	IP Paris	0,4	0,7	1,4	2,3	2,1	2,0
M. phlei	61	IP Paris	0,9	1,8	8,5	8,4	7,8	13,0
M. phlei	141	NCTC	0,3	0,5	0,8	1,0	1,7	1,1
M. phlei	171	NCTC	0,4	0,7	1,1	2,5	4,1	3,3
Orange B.	918	Pollak	0,8	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3
Orange B.	919	Pollak	—	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3
Yellow B. I	226	Pollak	0,3	0,3	1,0	1,5	1,1	0,7
Yellow B. II	232	Pollak	—	—	0,5	1,5	1,3	2,7
Grassberger	55 B	IP Paris	1,0	3,0	9,1	8,0	8,1	1,3
Friedmann	58	Richard	—	—	—	—	—	—
Bovine Lux	575	CCTM	—	—	—	—	—	—
Bovine 2	2	CCTM	—	—	—	—	—	—
Bovine	5	Copenhague	—	—	—	—	—	—
Bovine	6	CCTM	—	—	—	—	—	—
Bovine	9	CCTM	—	—	—	—	—	—
Bezançon	191	Bezançon	—	—	—	—	—	—
Bezançon	192	Bezançon	—	0,3	0,3	0,5	0,3	—
Bezançon	193	Bezançon	—	—	0,4	0,9	1,0	0,7
Bezançon	197	Bezançon	0,1	0,5	0,5	0,2	0,3	0,1
Avium	578	Courmont	—	—	—	—	—	—
Avium	608	CCTM	—	—	—	—	—	—
Avium	610	ATCC	—	—	—	—	—	—

TABLEAU V

Souches étudiées	Origine	Poids de l'urée (en mg.) lysée par 1/2 cc. de culture microbienne en :					
		24 h.	3 j.	6 j.	9 j.	12 j.	15 j.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCTM Lausanne	—	—	0,3	0,2	0,3	0,7
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	CCTM Lausanne	—	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCTM Lausanne	—	—	—	—	—	—
Bacille pyocyannique	CCTM Lausanne	—	—	—	—	—	—

TABLEAU VI
Proteus vulgaris

Souches étudiées	Origine	Poids de l'urée (en mg.) lysée par 1/2 cc. de culture microbienne en :			
		1 h.	3 h.	12 h.	24 h.
<i>Proteus vulgaris</i>	CCTM Lausanne	1,4	2,0	3,0	9,0

L'étude de ces résultats permet de dégager les conclusions suivantes :

1. Nos résultats se rapprochent plus de ceux donnés par Tacquet, Gernez-Rieux et Gaudier que de ceux donnés par Singer et Cysner. En effet, si certaines souches de Mycobactéries produisent de l'uréase, plusieurs autres n'en produisent pas du tout.
2. Les souches de provenance humaine que nous avons étudiées produisent de l'uréase. Il n'y a aucune corrélation entre cette propriété et la virulence ou la non-virulence de ces souches.

Les souches de provenance bovine que nous avons étudiées ne produisent pas d'uréase, sauf le BCG.

Mycobacterium phlei, ainsi que les quatre souches de Pollak et Bühler produisent de l'uréase.

Parmi les souches de paratuberculeux étudiés, il y en a qui produisent de l'uréase, d'autres pas.

Enfin, les souches d'origine aviaire ne produisent pas du tout d'uréase.

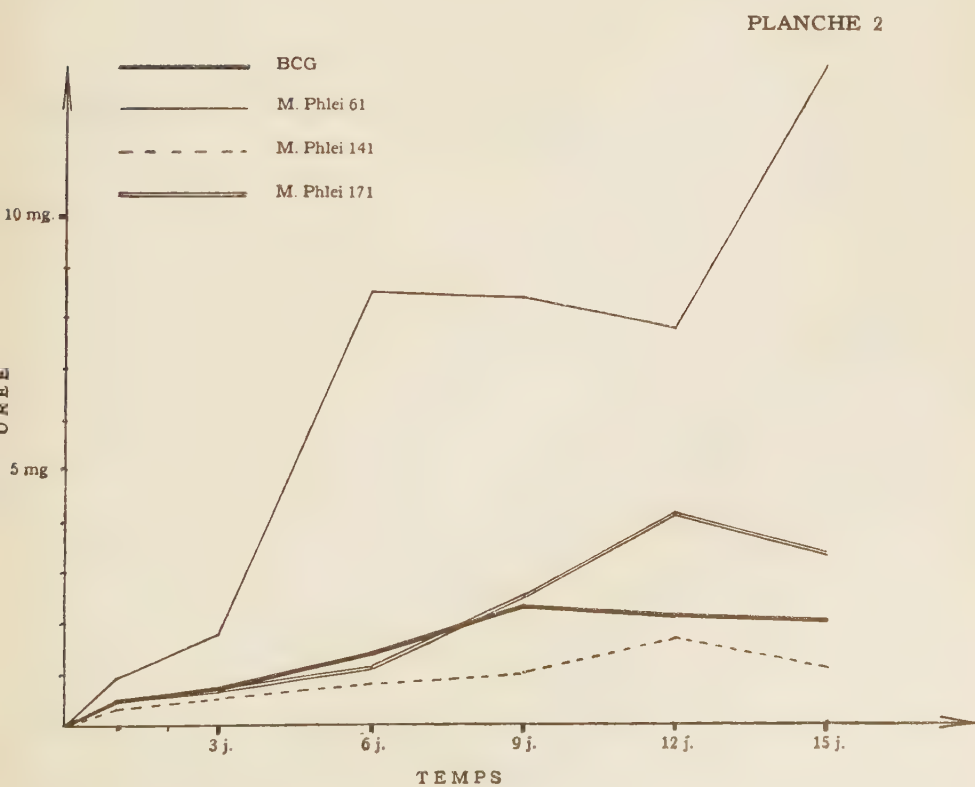
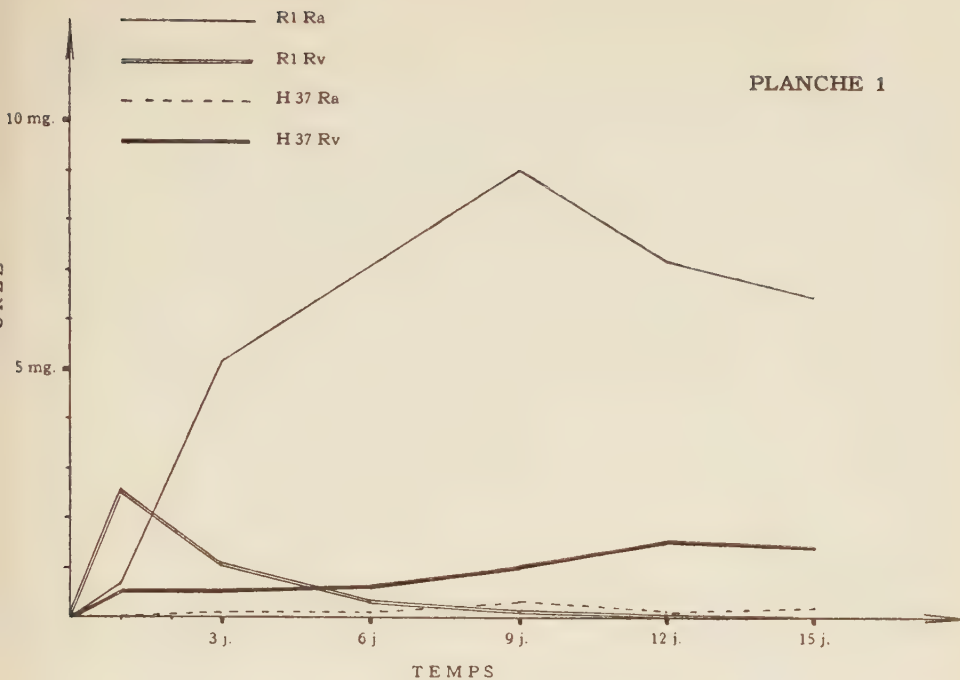


PLANCHE 3

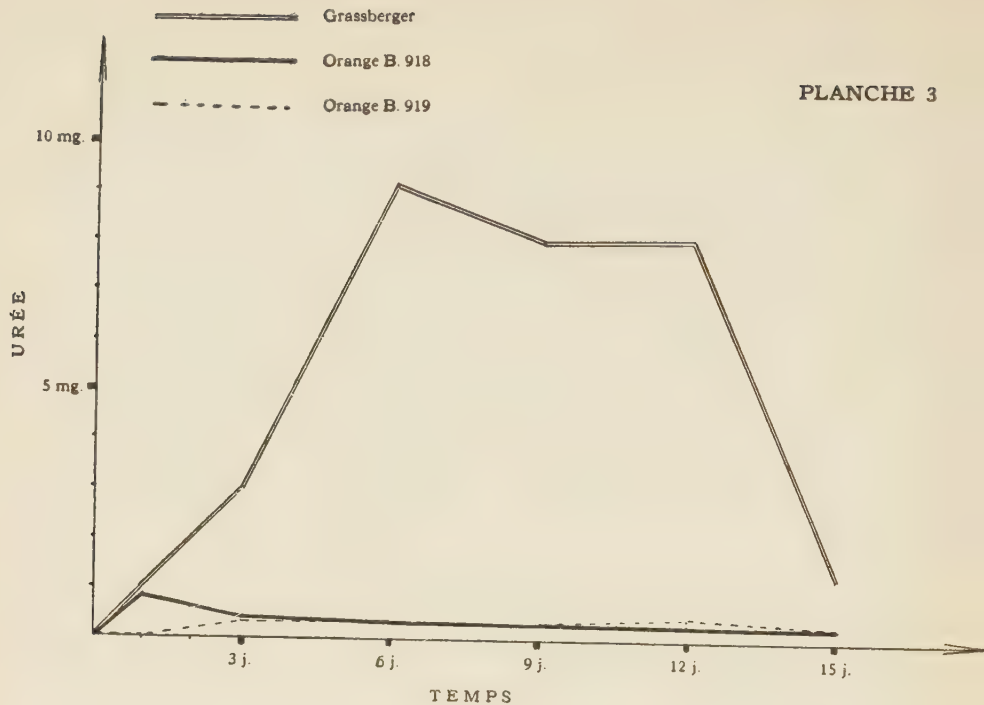


PLANCHE 4

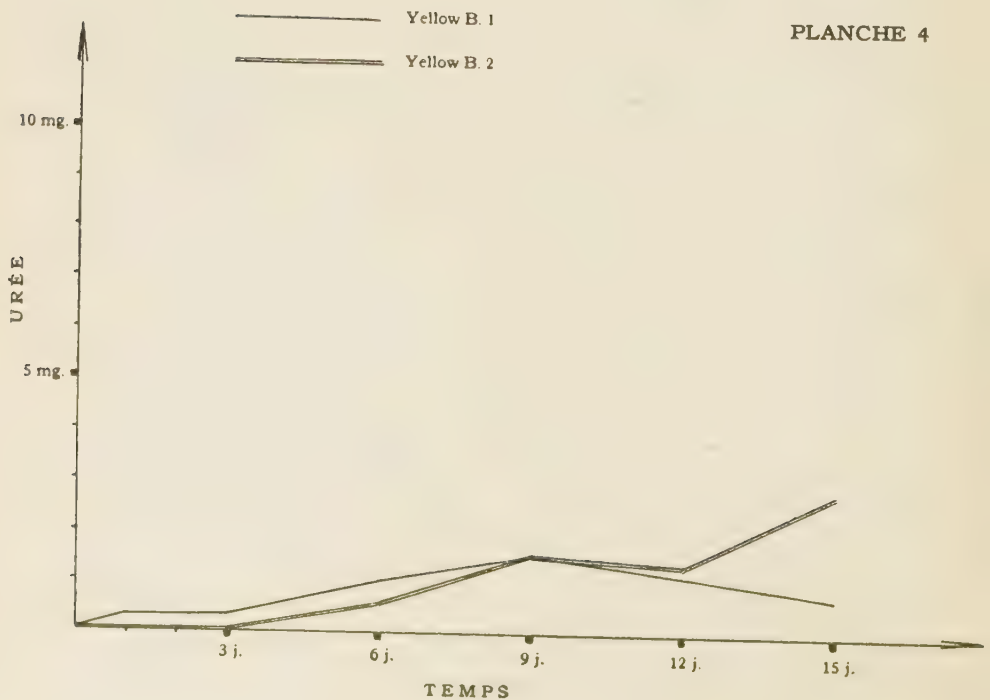


PLANCHE 5

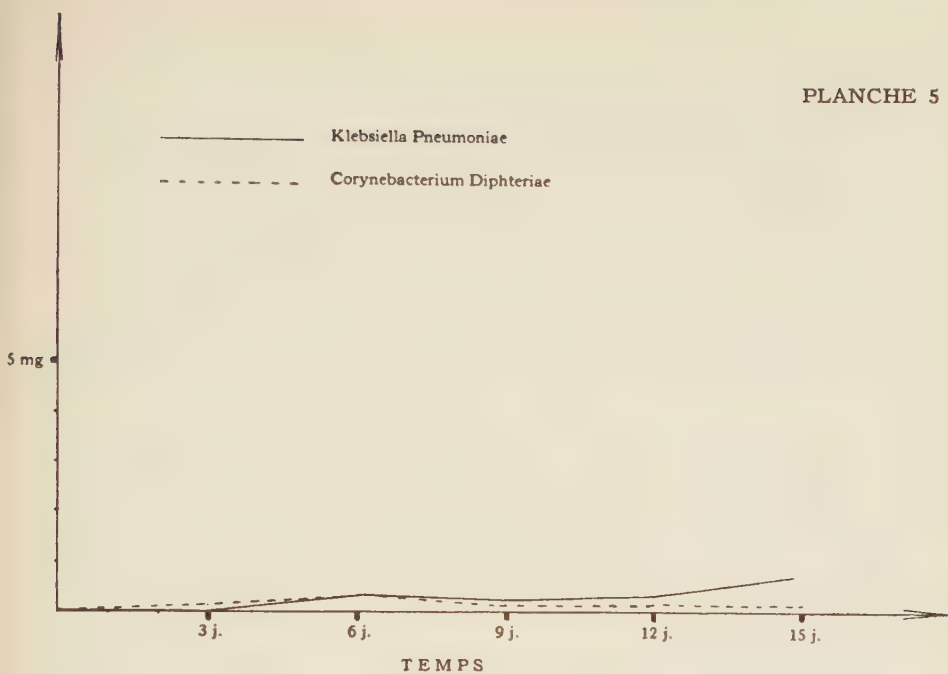
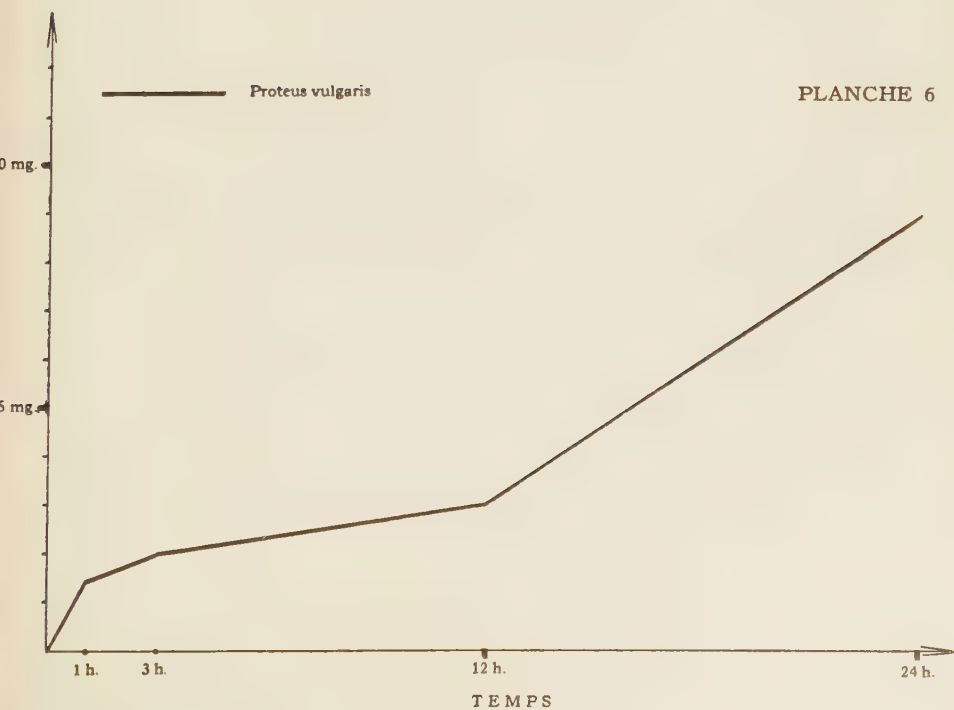


PLANCHE 6



3. Il n'est pas possible, pensons-nous, de tirer une conclusion définitive des courbes d'activité uréasique des souches uréase-positives. Ces courbes sont irrégulières, elles ne suivent aucune loi précise. On peut seulement remarquer, grossièrement, que l'activité uréasique semble augmenter en fonction du temps de contact avec l'urée et que cette augmentation semble avoir un sommet entre le 9^e et le 15^e jour d'incubation (exception faite pour la souche R1 Rv qui atteint le maximum d'activité uréasique en 24 heures et semble perdre ce pouvoir dans les jours suivants).

En conclusion générale, nous dirons avec Tacquet, Gernez-Rieux et Gaudier que, contrairement à ce que pensent Singer et Cysner, l'activité uréasique ne semble pas être une caractéristique des *Mycobactéries* et qu'il est donc impossible d'employer le test de l'uréase comme moyen diagnostic permettant la différenciation du genre *Mycobacterium*.

En second lieu, nous trouvons aussi que, dans les conditions opératoires citées, la plupart des souches que nous avons trouvé uréase-positives, se sont révélées positives après 24 heures de contact avec l'urée ; aucune corrélation entre les souches de bacilles tuberculeux d'une part et les souches de bacilles paratuberculeux d'autre part ; aucune spécificité en ce qui concerne les bacilles d'origine humaine. Donc impossibilité d'employer, comme l'ont préconisé Singer et Cysner, le temps de positivité du test de l'uréase, comme critère pour la classification et la différenciation des *Mycobactéries*.

Enfin, en dernier lieu, nous constatons que si les *Mycobactéries* peuvent hydrolyser l'urée, cette hydrolyse reste de loin inférieure, en intensité et en netteté, à celle provoquée par *Proteus vulgaris* qui hydrolyse en 24 heures autant d'urée que la plus puissante souche mycobactérienne uréase-positive étudiée, en 10 jours.

CHAPITRE V

Sommaire

L'enzyme uréase a la propriété essentielle et caractéristique de décomposer l'urée en CO_2 et NH_3 . Comme cette enzyme existe chez certaines bactéries, différents auteurs ont préconisé l'emploi du test de l'uréase comme un moyen d'identification de certains germes. Reprenant cette idée, uniquement dans la branche des Mycobactéries, Singer et Cysner, en 1952, décelaient la présence de l'uréase (par le test de la formation d'ammoniaque) chez 63 souches de Mycobactéries sur 65 étudiées, et formulaient une double conclusion :

1. L'uréase serait une enzyme caractéristique des Mycobactéries ;
2. On peut différencier les paratuberculeux des tuberculeux vrais par le temps d'action de cette uréase.

Ces résultats ont été contestés par Tacquet, Gernez-Rieux et Gaudier qui, employant cinq méthodes différentes de détection de l'uréase, trouvaient que beaucoup de souches de Mycobactéries ne possèdent pas d'uréase et qu'il ne semble pas y avoir de rapport entre l'existence d'uréase et la virulence du germe.

Constatant que toutes ces études relèvent du domaine de l'analyse qualitative uniquement, l'auteur essaye d'étudier chez un certain nombre de souches de bacilles tuberculeux et paratuberculeux l'intensité de cette activité uréasique, par des moyens d'analyse quantitative cette fois. Après avoir essayé plusieurs méthodes courantes, il a choisi celle du xanthidrol, méthode pondérale précise. Les germes, cultivés en milieu de Dubos, sont ensemencés en milieu liquide à l'urée (eau

physiologique à 2 0/0 d'urée) ; la température d'incubation : 37° C (sauf pour les aviaires : 42° C) ; le premier titrage d'urée se fait après 24 heures d'étuve, puis tous les 3 jours jusqu'au 15^e jour. Deux milieux témoins ont été employés, l'un à l'urée mais sans germe, l'autre avec germe mais sans urée.

Les résultats confirment, dans l'ensemble, ceux de Tacquet, Gernez-Rieux et Gaudier :

1. De nombreuses souches de Mycobactéries n'hydrolysent pas l'urée ;
2. Il ne semble pas y avoir de corrélation entre le degré d'activité uréasique et la virulence du germe ;
3. L'étude des courbes d'activité uréasique ne semble révéler aucune loi précise.

Il serait donc impossible d'employer le test de l'uréase comme un moyen d'identification ou de classification des Mycobactéries.

BIBLIOGRAPHIE

1. BARRETT et JOHNE Biochem. J., 1932, 26, 1246.
2. BOIVIN Bull. Soc. Chim. biol., 1926, 8, 456.
3. BOIVIN J. Pharm. Chim., 1926, 4, 445.
4. BONNAY R. Thèse Doctorat (Pharmacie), Paris, 1946.
5. CHRISTENSEN W. B. J. Bact., 1946, 52, 461-466.
6. CONWAY Biochem. J., 1933, 27, 430.
7. CONWAY et BYRNE Biochem. J., 1933, 27, 419.
8. CORDEBARD Bull. Soc. Chim. biol., 1928, 10, 461.
9. CORPER H. J. et
SWEANY H. C. J. Bact., 1918, 3, 129-151.
10. CUNY et ROBERT J. Pharm. Chim., 1932, 15, 7.
11. CUNY et ROBERT J. Pharm. Chim., 1930, 11, 337.
12. DICKENS F.
in BAMANN and
MYRBACK Die Methoden der Fermentforschung. Georg Thieme
Verlag, 1941, 2682-2690.
13. DIXON M. Manometric methods. Cambridge, 1934.
14. ELEK St. D. J. Path. Bact., 1948, 60, 183-192.
15. FERGUSON W. W. et
HOOK A. E. J. Lab. Clin. Med., 1943, 28, 1715-1719.
16. FIESSINGER,
HERBAIN et OLIVER Diagnostics biologiques et fonctionnels. 1949, 607-
611.
17. FIORENTINO Chem. Zentr., 1930, 2, 2926.
18. FLEISCH A. Travaux pratiques de physiologie et de chimie
physiologique. Guide de laboratoire, p. 51.
19. FLORKIN M. Biochimie générale. Masson, 1943, 134-145.
20. FOLIN et BELL J. biol. Chem., 1917, 29, 329.
21. FOLIN et YOUNGBURG J. biol. Chem., 1919, 38, 111.
22. FOSSE R., ROBYN A. C. R. Acad. Sci. (Paris), 1914, 159, 367.
et FRANÇOIS F.
23. FRANÇOIS Thèse. Lille, 1929.

24. FRANÇOIS C. R. Acad. Sci., 1930, 190, 800.
25. FUCHS Mikrochemie, 1930, 8, 159.
26. GALE E. The chemical activities of Bacteria, 1947, 62-116.
27. GALE E. Bact. Rev., 1943, 7, 139.
28. GASTINEL Précis de Bactériologie médicale. Masson, 1949, 423.
29. GENTZKOW J. biol. Chem., 1942, 143, 540.
30. GIBSON T. J. Bact., 1935, 28, 295-311 et 313-322 ; 1935, 29, 491-502.
31. GLASMANN Z. physiol. Chem., 1926, 160, 77 ; 1927, 162, 148.
32. GOLSE Bull. Soc. Chim. biol., 1925, 7, 167.
33. GRADY Chem. Zentr., 1930, 2, 2171.
34. HAUDUROY P. Technique bactériologique, 1951, 165.
35. HAUDUROY P. Technique bactériologique, 1951, 68.
36. HAWK P.B., OSER B.L. Practical Physiological Chemistry, 1951, 498-506 et SUMMERSON W.H. et 822-831.
37. HENCH et ALDRICH Chem. Zentr., 1927, 11, 306.
38. HOWELL S.F. et SUMNER J.B. J. biol. Chem., 1934, 104, 619-626.
39. KAHANE Bull. Soc. Chem., 1927, 41, 110.
40. KARR J. Lab. Clin. Med., 1924, 9, 3.
41. KREBS H. A. in OPPENHEIMER C. Die Fermente und ihre Wirkungen. Georg Thieme Verlag, 1929, 635-670.
42. KUMABE H. et ARIMA J. Kekkaku (Tuberculosis), 1950, 25, 105-109.
43. LAUDAT M. J. Pharm. Chim., 1921, 23, 5.
44. LOBSTEIN Thèse Doctorat (Sciences), Strasbourg, 1922.
45. LUCK J. Bioch. Chem., 1928, 79, 211.
46. MESTREZAT et JANET P. J. Pharm. Chim., 1920, 22, 369.
47. MISCHOUSTIN E. N. Zbl. Bakt., 1932, 2 Abt. 87, 150-166.
48. MIWA T. et YOSHII S. Sciences Reports, 1934. Tokyo, Bunrika Daigaku, 1, 243-270.
49. MOUNIER Un. pharm., 1933, 75, 321.
50. NICLOUX et WELTER C. R. Soc. Biol., 1922, 87, 584.
51. PHILIBERT J. Pharm. Chim., 1921, 24, 5.
52. PORTER J. R. Bacterial Chemistry and Physiology, 1946, 463, 530, 605.
53. RANGIER M. et KREBS M. Bull. Soc. Chim. biol., 1954, 36, 1479.
54. RUSTIGIAN R. et STUART C. A. Proc. Soc. exp. Biol., 1941, 47, 108-112.

55. SAKAGUCHI K. et SHIZUME Y. J. Agr. Chem. Soc. Japan, 1937, 13, 309-312.
56. SCHMIDT Arch. Pharm., 1917, 255, 346.
57. SCHUMM Chem. Zentr., 1931, 1, 2646.
58. SIMONART P. Introduction à la Microbiologie générale, 1947, 102-105.
59. SINGER J. et CYSNER E. Amer. Rev. Tuberc., 1952, 65, 779-782.
60. SOEHNGEN Zbl. Bakt., 1913, 37, 595-609.
61. SORGDRAGER Chem. Zentr., 1936, 1, 125.
62. SPRAETH Chemische und mikroskopische Untersuchung des Harns. 1936, Leipzig, Barth.
63. STEHLE J. biol. Chem., 1921, 47, 13.
64. STUART C. A., VAN STRATUM E. et RUSTIGIAN R. J. Bact., 1945, 49, 437-444.
65. SUMNER et SOMERS Laboratory experiments in biological chemistry, p. 138, New York.
66. TACQUET A., GERNEZ-RIEUX C. et GAUDIER B. Ann. Inst. Pasteur, Lille, 1953, 6, 80-93.
67. TACQUET A., GERNEZ-RIEUX C. et GAUDIER B. Ann. Inst. Pasteur, 1954, 87, 335.
68. TIAN et ROCHE Chimie, 1942, 697. Masson éditeur.
69. TSUNG CHENG et SUEI CHENG J. Formosan med. Ass., Taïpeh, 1949, 48, 9-10.
70. UKABE K. Fukuoka Acta med., 1936, 29, 135-136.
71. UTZIMO S., IMAIZUMI J. Bioch. Japan, 1938, 27, 257-264.
M. et NAKAYAMA M.
72. VAN SLYKE et CULLEN J. biol. Chem., 1914, 11, 211 ; 1916, 24, 117.
73. WARBURG O. The metabolism of tumors, 1930, traduit de l'allemand par Dickens F., Constable and Co.
74. WENGER, ZIMERMAN et MAULTBETSCH Mikrochemie, 1934, 14, 132.
75. WHITE et RICKER Chem. Zentr., 1929, 11, 614.
76. WOHLFEIL T. et WEILAND P. Zbl. Bakt., 1937, 138, 388-400.
77. WORTHINGTON et LUCK J. biol. Chem., 1929, 82, 693.
78. YOSHIMATZU Chem. Zentr., 1930, 2, 1894.
79. YOUNGBURG J. biol. Chem., 1921, 45, 391.

